

LIPOSOME FILLING AMPHIPATHIC PARTICLE EFFECTIVELY AND DISCHARGING CONTROLLABLY

Publication number: JP2196713

Publication date: 1990-08-03

Inventor: YACHIEZUKERU BARENHORUTSU; GIRADO HARAAN

Applicant: YISSUM RES DEV CO

Classification:

- international: A61K9/127; A61K49/22; B01J13/02; A61K9/127; A61K49/22; B01J13/02; (IPC1-7): A61K9/127

- European: A61K9/127P2; A61K49/22P16

Application number: JP19890253682 19890928

Priority number(s): US19880250687 19880928

Also published as:



EP0361894 (A2)

US5192549 (A1)

LU88856 (A9)

EP0361894 (A3)

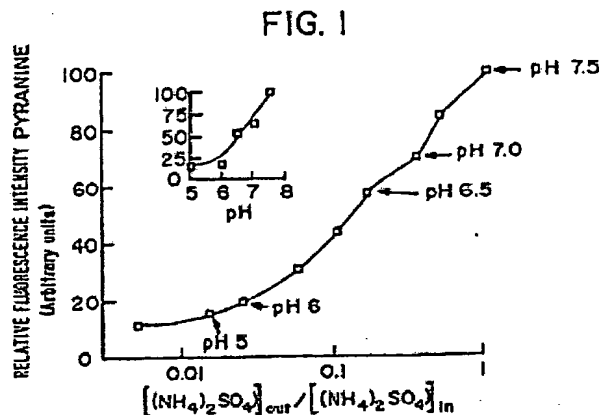
EP0361894 (B1)

Report a data error here

Abstract of JP2196713

PURPOSE: To efficiently pack an amphipathic medicine in a large packing amount simply and rapidly by forming the gradient of ammonium ion between an internal aqueous phase and an external aqueous phase of liposome.

CONSTITUTION: A suspension of liposome is prepared in the presence of ammonium sulfate. The external aqueous phase of the prepared suspension is diluted with a proper salt or buffer solution or ammonia is removed from an external aqueous phase, a natural ammonia molecule is diffused from an inner aqueous phase to the external aqueous phase to form a gradient of ammonium from the inside to the outside and a gradient of pH from the outside to the inside between the internal aqueous phase and the external aqueous phase. Then a deprotonized amphipathic medicine is packed from the outside into the inside, bonded to a liberated protein left in the aqueous phase and accumulated in the liposome. When a reverse pH gradient state occurs, the bonded medicine is dissociated into a proton and the deprotonized medicine to release the deprotonized medicine or the liposome.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-196713

⑤ Int. Cl.⁵

A 61 K 9/127

識別記号

庁内整理番号

C

7624-4C

⑬ 公開 平成2年(1990)8月3日

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全25頁)

⑭ 発明の名称 両親媒性分子を有効に充填かつ制御放出するリボソーム

⑯ 特 願 平1-253682

⑰ 出 願 平1(1989)9月28日

優先権主張 ⑱ 1988年9月29日 ⑲ 米国(US) ⑳ 250,687

⑳ 発 明 者

ヤチエズケル バレン イスラエル国 エルサレム 93707 ネイブ シヤナン
ホルツ 18

㉑ 出 願 人

イツサム リサーチ イスラエル国 エルサレム 91042 ビー.オー.ボックス
デベロップメント カ ス 4279 ヤボテインスキー ストリート 46
ンパニー オブ ザ
ヒーブルー ユニバー
シティー オブ エル
サレム

㉒ 代 理 人

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

両親媒性分子を有効に充填かつ制御放出するリボソーム

2. 特許請求の範囲

1. 両親媒性薬剤をリボソームに有効に充填するシステムであって、

アンモニウム化合物またはアンモニウム塩の存在下でリボソーム懸濁液を調製し、該懸濁液を緩衝剤または塩で希釈して、内部水性相と外部水性相との間に、内側から外側へ向かうアンモニウム勾配と、リボソームの内側のpHが外側のpHより酸性側であるようなpH勾配とを与えることを包含する、システム。

2. 前記アンモニウム化合物が、硫酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、または炭酸アンモニウムである、請求項1のシステム。

3. 前記両親媒性薬剤が、ドキソルビシン、ダウノルビシン、クロロキノン、プロブラノロール、

ベンタミジン、エビルピシン、カルシノマイシン、N-アセチルアドリアマイシン、ルビダゾン、5-イミドダウノマイシン、N-アセチルダウノマイシン、すべてのアントラシリン薬剤、ダウノリリン、プロブラノロール、ベンタミジン、ジブカイン、テトラカイン、プロカイン、クロルプロマジン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、マイトマイシンC、ビロカルピン、フィゾスチグミン、ネオスチグミン、クロロキン、アモジアキン、クロログアニド、プリマキン、メフロキン、キニーネ、ブリジノール、プロジピン、ベンズトロピン・メシレート、塩酸トリヘキシフェニジル、プロブラノロール、チモロール、ビンドロール、キナクリン、ベンダドリル、プロメタジン、ドバミン、セロトニン、エビネフリン、コデイン、ナベリジン、メタドン、モルフィン、アトロピン、デシクロミン、メチキセン、プロバンテリン、イミプラミン、アミトリプチリン、ドキシセピン、デシプラミン、キニジン、プロブラノロール、リドカイン、クロルプロマジン、プロメタジン、ペルフェナジン、ア

特開平2-196713 (2)

クリジン・オレンジ、プロスタグランジン、フルオレセイン、およびカルボキシフルオレセインである、請求項2のシステム。

4. 両親媒性分子が、その濃度によってリボソームから流出するアンモニウムと入れ換わってリボソーム内に充填され、薬剤の充填度が、外側と内側との硫酸アンモニウムの比率と、内部水性相のpHとに依存する、請求項3のシステム。

5. 両親媒性分子をリボソーム内に有効に充填する方法であって、

(a)硫酸アンモニウムの存在下でリボソームの懸濁液を調製すること；

(b)該工程(a)で得られた懸濁液の外部水性相を適切な塩もしくは緩衝剤で希釈するか、またはアンモニアを除去することによって、内側から外側へ向かうアンモニウム勾配と、外側から内側へ向かうpH勾配とを形成させること；および

(c)脱プロトン化した両親媒性薬剤をリボソームの外側から内側へ充填すること、

を包含する方法。

向かう逆のpH勾配を形成することによって、両親媒性薬剤をリボソームから放出するのに適切な、リボソームとアンモニウム塩との懸濁液。

10. 二酸化炭素を発生し、該二酸化炭素を組織に放出して、超音波画像形成法における超音波エコー源性を高めるのに適切なアンモニウムリボソーム。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、トランスメンブラン勾配を利用して、両親媒性薬剤や化学薬品をリボソームに効率よく充填するための、簡単で、効率のよい、安全で、経済的で、迅速な改良されたトランスメンブラン充填法に関する。両親媒性薬剤を充填して得られたリボソームは、安定かつ安全である。この方法は、リボソームに封入された薬剤の緩徐放出にも同様に利用できる。

(従来の技術)

近年、製薬科学によって、新規な製剤要素として、脂質を基材にした担持媒体であるリボソーム

6. 前記両親媒性薬剤が、アンモニウム勾配によって、アンモニウムが流出するのに入れ換わって流入して、リボソームに充填される、請求項5の方法。

7. リボソームの外側水性相を希釈するか、またはこの水性相からアンモニウムを除去して、リボソームの内側水性相から外側水性相へ向かうアンモニウム勾配を形成させることによって、両親媒性薬剤をリボソームに充填するのに適切な、リボソームとアンモニウム塩との懸濁液であって、内側から外側へ向かう該アンモニウム勾配によって、外側から内側へ向かうpH勾配が形成され、両親媒性薬剤がリボソーム内に充填される、

リボソームとアンモニウム塩との懸濁液。

8. 塩または緩衝剤でリボソーム懸濁液のアンモニウムを希釈するか、または除去することによって形成された、内側から外側へ向かうアンモニウム勾配を有する、両親媒性薬剤充填用のアンモニウムリボソーム。

9. リボソームの内部水性相から外部水性相へ

が開発された。最近、通常のリボソーム類もしくはリン脂質のリボソーム類が、広範囲の化合物の治療活性を改良し、簡便な薬剤放出系を提供する製剤剤として急速に受け入れられるようになっていた。リボソームによる薬剤放出系は、*Cancer Res.*, 43: 4730 (1983); *Pharmacol. Rev.*, 36: 277-336 (1984); *Liposomes as Drug Carriers*, Gregoriadis, G. 編集, Wiley, ニューヨーク (1988) に詳細な総説が記載されている。

リボソームは、非経口的、経口的、局所的、および吸入による、薬剤の投与に適切な放出用媒体である。リボソームは、配合法を改良し、放出持続性を与え、治療比率を改善し、各投与後の治療活性を延長し、頻繁な投与の必要性を減らし、薬剤の必要量および/または粘膜組織などの組織が吸収する量を減らす。

薬剤のリボソームへの充填量が、薬剤の効力の尺度であることが証明されている。充填量が少なければ、活性薬剤が大きく失われ、リボソームを薬学的媒体として使うことが不経済になる。近年、

特開平2-196713 (3)

リボソームに、薬剤と生物物質とを充填する各種方法のシステム開発に少なからぬ努力がなされている (*Pharmacol. Rev.*, 36: 277-336 (1984); *Liposomes as Drug Carriers*, Gregoriadis, G. 編集, Wiley, ニューヨーク (1988))。

これまで、リボソームに薬剤を充填する方法は、いくつも開発されている。最も単純な薬剤充填法は、脂質成分を中和することによって、乾燥した脂質膜に、水溶性薬剤を受動的に封入する方法である。この方法の充填効率は、リボソームの封入体積と、リボソームを製造するのに用いる脂質の量とによって決まるので、一般に低い (*Chem. Phys. Lipids*, 40: 333-345 (1986); および *Methods in Biochemical Analysis*, 33: 337 (1988))。この方法の欠点は、低い封入性、不均一な大きさ、および押出しもしくは音波処理のような二次的処理工程が必要なことである。薬剤をリボソームに受動的に封入する方法の改良が、脱水・再水和法を利用することによって達成された。この方法は、予め形成されたリボソームを薬剤の水溶液に添加

し、得られた混合物を、凍結乾燥もしくは蒸発させるか、または多重ラメラ小胞の凍結・解凍を繰り返して行う凍結・解凍処理法で脱水することによって、水和を改良し充填量を増大させる方法である。この方法の欠点は、不均一な大きさ、標準化が困難なこと、および低い再現性である。

リボソームに薬剤を高い効率で封入することは、高濃度の脂質を用いかつ脂質成分の特別な組合せによって実施できる。例えば、両親媒性アミンのドキソルビシンは、負の電荷を有するリボソームメンブランには一層よい効率で封入することができる (*Cancer Res.*, 42: 4734-4739 (1982))。しかし、一般に、この薬剤充填法には問題点が残っている。

リボソームへの薬剤充填の効率は、薬剤の化学的性質にも依存している。一般に、水溶性もしくは脂質に溶解性の薬剤は処理が容易である。その理由は、脂質に溶解性の化合物は、リボソーム形成中、脂質二重層内に容易に取り込まれ、水溶性の化合物は、リボソームの内側に向いているホス

ホリピドの極性基を持つ頭部 (polar head group) と相互作用してリボソーム内に隔離されるからである。他方、両親媒性化合物は、脂質二重層を急速に透過し、結合しないのでリボソーム内に保持することは最も難しい。両親媒性分子をリボソームに充填する方法として提案された方法が、*Chem. Phys. Lipids*, 40: 333-345 (1986) に記載されているが、この方法は、イオンpH勾配に対応して薬剤を充填する方法であって、リボソーム内部のpHが外部の媒体のpHより低い場合に、両親媒性薬剤をリボソーム内に蓄積する方法である。

1986年6月16日付で出願された国際特許出願PT/US87/01401号には、制御されたpHの水性環境で製造され、次いで比較的強い酸性pHかまたは比較的強い塩基性pHの浴媒体に曝露されたイオン化可能な脂質もしくはイオン化可能なタンパクを含有する非対称的リボソーム小胞が記載されている。

J. Biol. Chem., 260:802-808 (1985) に記載されている両親媒性薬剤の充填法は、トランスメンブラン Na^+/K^+ 勾配を利用する方法である。局所

麻酔剤であるジブカインの充填の改良が認められたのは、ナトリウムとカリウムとの両イオンが使用された場合だけであり、ナトリウム/カリウムの勾配をバリノマイシンと組み合わせて使用した場合に、約52%の充填が達成された。バリノマイシンは、殺虫剤、殺線虫剤、殺菌剤、およびイオン透過担体として周知のものであるから、薬剤処方物への添加剤として望ましいものではない。抗新生物薬のリボソーム小胞への受動封入法が、*Biochem. Biophys. Acta*, 816:294-302 (1985) に記載されているが、これはバリノマイシン依存性の K^+ の拡散電位にตอบสนองして薬剤を小胞に取り込むのを利用する方法である。

リボソーム小胞に両親媒性薬剤のアドリアマイシンを充填する他の方法が、*Biochem. Biophys. Acta*, 857:123-126 (1985) に記載されているが、pH勾配にตอบสนองしてリボソームにアドリアマイシンを取り込む方法である。この方法は非生理学的に酸性のpH下と、強塩基である KOH の存在下と(両方とも脂質の加水分解を起こす)で行われることを除け

特開平2-196713 (4)

ば、充填はかなり効率的に行われるようである。また、得られたリボソーム-薬剤の小胞は不安定であり、約24時間で薬剤がかなり漏出する。

1985年8月7日付で出願された国際特許出願PCT/US85/01501号には、水性媒体に溶解した場合に荷電状態で存在する脂質親和性のイオン化可能な抗新生物薬を、トランスメンブラン電位によって受動充填することによって、抗新生物薬をリボソームに封入する方法が記載されている。最初、低pH緩衝液を（受動的に）封入し、次いで塩基を添加して外部のpHを上昇させることによって、プロトンの勾配が形成される。トランスメンブラン電位は、バリノマイシンの存在下、ナトリウム／カリウムの化学的勾配によって達成される。充填は温度依存性で、最高の結果は、60℃の温度で得られる。

水溶性薬剤をリボソームに高封入度で充填する方法が、細菌、米国特許第4,752,425号に記載されている。しかし、この方法の欠点は、高い脂質濃度での受動封入に基づいていないということである。

のに有用である。

本発明のある局面は、両親媒性薬剤をリボソームに充填し、制御して徐放するのに用いる、単純で、安全、迅速、安定、好効率、および経済的なアンモニウムトランスメンブラン勾配システムである。

本発明の他の局面は、両親媒性薬剤のリボソームへの充填が、リボソーム小胞の内部と外部との水性相間の NH_4^+ とpHとの勾配に依存するシステムである。そして、これらの勾配は、リボソームをアンモニウム溶液内で形成させ、次に得られたリボソームの外部水性相のアンモニウムを除去するか、または希釈することによって形成され、その結果生成したアンモニウムの勾配によって、内部水性相から外部水性相へ向かう中性アンモニアの流出がおり、従って内部水性相内にアンモニアが残したプロトンが蓄積することによって外側から内側へ向かう逆のpH勾配が形成される。脱プロトン化した両親媒性薬剤は、pH勾配によって、リボソーム内に流入して流出したアンモニウムに取

る。

これらの方法すべての基本的な欠点は、リボソームの脂質を低いpHの環境に長時間曝露し、そのため脂質の加水分解をもたらす、リボソームからの薬剤の漏出が起こること、充填に長時間と高温とが必要なこと、および安定性の問題である。

（発明の要旨）

本発明は、リボソーム小胞のメンブランの両面にアンモニウムイオン（ NH_4^+ ）の勾配を生成させることによって、リボソームへ薬剤を充填し、かつ薬剤を徐放するための単純で迅速、安定、経済的、安全、および効率のよいシステムを提供するものである。このシステムは従属的な方法ではない。すなわち、リボソーム製造法の全部と、すべての種類のリボソームとを本発明を実施するのに使用することができる。また、このシステムは、リボソームのアンモニウムイオンの勾配を、超音波による画像形成を促進する超音波エコー源性を有する CO_2 （hyperechogenic CO_2 ）の起源として利用することによって、超音波画像形成法を行う

って換わる。

本発明のさらに他の局面は、リボソームのアンモニウム勾配を、超音波による画像形成用の CO_2 を発生させるのに利用することである。

両親媒性薬剤をリボソームに有効に充填する本発明のシステムは、アンモニウム化合物またはアンモニウム塩の存在下でリボソーム懸濁液を調製し、該懸濁液を緩衝剤または塩で希釈して、内部水性相と外部水性相との間に、内側から外側へ向かうアンモニウム勾配と、リボソームの内側のpHが外側のpHより酸性側であるようなpH勾配とを与えることを包含する。

両親媒性分子をリボソーム内に有効に充填する本発明の方法は、(a)硫酸アンモニウムの存在下でリボソームの懸濁液を調製すること；(b)該工程(a)で得られた懸濁液の外部水性相を適切な塩もしくは緩衝剤で希釈するか、またはアンモニアを除去することによって、内側から外側へ向かうアンモニウム勾配と、外側から内側へ向かうpH勾配とを形成させること；および(c)脱プロトン化した両親

特開平2-196713 (5)

媒性薬剤をリボソームの外側から内側へ充填することを包含する。

本発明のリボソームとアンモニウム塩との懸濁液は、リボソームの外側水性相を希釈するか、またはこの水性相からアンモニウムを除去して、リボソームの内側水性相から外側水性相へ向かうアンモニウム勾配を形成させることによって、両親媒性薬剤をリボソームに充填するのに適切であり、内側から外側へ向かう該アンモニウム勾配によって、外側から内側へ向かうpH勾配が形成され、両親媒性薬剤がリボソーム内に充填される。

本発明の他のリボソームとアンモニウム塩との懸濁液は、リボソームの内部水性相から外部水性相へ向かう逆のpH勾配を形成することによって、両親媒性薬剤をリボソームから放出するのに適切である。

本発明の両親媒性薬剤充填用のアンモニウムリボソームは、塩または緩衝剤でリボソーム懸濁液のアンモニウムを希釈するか、または除去することによって形成された、内側から外側へ向かうア

ンモニウム勾配を有する。

本発明の他のアンモニウムリボソームは、二酸化炭素を発生し、該二酸化炭素を組織に放出して、超音波画像形成法における超音波エコー源性を高めるのに適切である。

(発明の構成)

調製物の詳細な説明

両親媒性薬剤をリボソームに充填し、次いで該薬剤をリボソームから制御して放出する本発明の新規なシステムは、リボソームの内部水性相と外部水性相との間にアンモニウムイオン (NH_4^+) の勾配を形成させたことに基づいたものである。このアンモニウムイオンの勾配は、両親媒性分子の充填もしくは放出の所望の比率にしたがって、外部水性相のアンモニウムイオンを除去するか、もしくは希釈することによって形成される。このような除去処理によって、内部相のアンモニウムイオンの濃度が外部相より高くなる。リボソーム内の水性相のアンモニウムイオンの濃度が高いと、内部媒体から外部媒体へと中性アンモニア分子 (

NH_3) の拡散が起こる。リボソームから流出する NH_3 分子毎に、1つのプロトンが残る。このようにpH勾配が形成され、リボソームの内部水性相は外部媒体よりも酸性になる。この勾配の大きさは、外部 (NH_4^+) / 内部 (NH_4^+) の比で測定される。

弱い両親媒性化合物は、リボソームの内部よりも高いアルカリ性pHの外部相を有するシステムが形成されたならば、通常は透過できないメンブランでも通過できるはずである。このようなシステムは、自然に平衡化しようとする。すなわち、内側と外側とのpHが同じになろうとする。このようなpHの平衡化が可能かどうか、またはその平衡化がどの位に速く起こるかは、リボソーム内部水性相を外側水性相から隔てているメンブランの化学的特性と、媒体の組成とによって決まる。リボソームは、その脂質二重層によって、上記の平衡化に対して自然に抵抗する最適のメンブランバリアーを提供する。リボソーム自体は、硫酸アンモニウムのような適当な媒体中で形成され、この媒体の一部が、ある程度リボソーム内に封入され、あ

る内部pHを有する硫酸アンモニウム含有リボソームを形成する。このpHは、リボソーム内部に充填された硫酸アンモニウムの量と、リボソーム外部の硫酸アンモニウムの量との差によって決まる。この外部と内部との量が同じならば、両方のpHは、硫酸アンモニウム溶液のpHと同一か、または緩衝液が硫酸アンモニウムに添加される場合は、緩衝液/硫酸アンモニウムのpHと同一である。しかし、外部の硫酸アンモニウムが異なる塩で、置換、希釈、もしくは交換されると、リボソームの内部は、迅速に反応してpHを酸性側に変化させる。

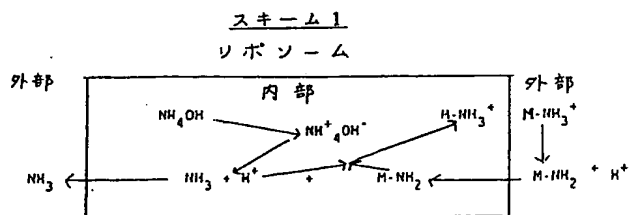
リボソーム内で、硫酸アンモニウムは、硫酸アニオンとアンモニウムカチオンに解離し、またこのカチオンはさらに解離して中性のアンモニアとプロトン (H^+) となる。リボソームメンブランを自由に透過できる中性のアンモニアは、本発明を実施する際、他の化合物、例えば両親媒性の脱プロトン化薬剤と交換することができる。このような薬はリボソーム内に浸透し、アンモニアが脱離して残っている遊離のプロトンが、該薬剤と結合

特開平2-196713 (6)

する。このようにして薬剤は、プロトン化されてリボソームの外へ透過せず、逆のpH勾配状態が起こると、リボソーム内で、プロトンと脱プロトン化された薬剤とに解離し、その結果リボソームから外に透過可能になる。

外部のアンモニウムイオン量を低下させることによってリボソームの内部から外部に向かうアンモニウムイオン勾配を形成すると、内部のアンモニウムイオンは、外部に向かって透過してトランスメンブラン・アンモニウム平衡に到達しようとし、その結果、アンモニアが排除され、プロトン H^+ が残ることによって、pHの非平衡状態が起こり、pHはリボソームの内部の方が小さくなる。このようにして、リボソームメンブランを透過することが可能であり、脱プロトン化できるいずれの入手しうる両親媒性薬剤も充填できる。ある数のアンモニウム分子がリボソームから離脱すると、同数の両親媒性薬剤分子が、外部環境から供給されて、離脱したアンモニウム分子に入れ換わってリボソームに入る。それ故に、脱プロトン化された形態

で、リボソームメンブランを透過することができ、外部環境に存在するいずれの薬剤も、上記の方法によってリボソーム中に効率よく充填することができる。リボソーム内で薬剤はプロトン化され、そのためトラップされて漏出することができず、リボソーム内に弱い両親媒性物質が蓄積される。アンモニウム勾配を形成するシステムをスキーム1に示す。



このスキームに示す水酸化アンモニウムは、スキーム1に従って、リボソーム内で解離して中性

のアンモニアとプロトン H^+ となる。硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、または他のアンモニウム化合物で取り換えることができる。Mは、例えばスキームに示す第一級アミノ基のような反応部位を有する両親媒性分子である。

このようにして、かなりの測定可能な量の弱い両親媒性薬剤をリボソームに充填することができ、充填量と充填速度とを操作することができ、またリボソームからの薬剤の放出も同じシステムで制御することができる。勾配の安定性は、リボソームの脂質の組成と、脂質二重層が無傷なことが関与する。形成されるpH勾配は、両親媒性薬剤の、リボソームへの充填と、リボソームからの放出との両方を制御するのに利用することができる。この勾配は、両親媒性薬剤を充填する起プロトン力として作用し、また逆に、薬剤を放出する力として作用する。

この方法は、他の類似の勾配充填法に対して次のような改良点を示している。すなわち、本発明

の方法は、特別な化学薬剤や装置を必要としないので、簡単であり、またリボソームに薬剤を充填するのに、ごく短時間しか必要としないので迅速である。また、この方法は、脱水などの保存法を用いる必要なしに、2週間以上安定な薬剤充填リボソームを提供し、高いpHもしくは高温によって起こる加水分解から脂質を保護し、また最も安価で容易に入手しうる化学薬品と装置だけを使うので経済的であり、また強い酸もしくは塩基を必要とせず、中性の硫酸アンモニウム勾配を利用する点で安全であり、遊離の薬剤を余分に必要とすることに起因する損失なしで封入可能な薬剤のほとんど100%をリボソームに封入できるので効率的である。

リボソームの内側と外側との間にpH勾配を形成するシステムは、水酸化物のようなアンモニウム化合物、または硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウムのような塩をリボソーム小胞内に封入し、外部の硫酸アンモニウムを、非透過性のアニオンを有

特開平2-196713 (7)

する異なる塩で交換することによるものである。適切な塩としては、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩、炭酸塩、シアノ酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、臭化物、炭酸水素塩などと、ナトリウム、カリウム、カルシウム、リチウム、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、ニッケル、銅などの塩、臭化物、塩化物、ヨウ化物、フッ化物などがあるが、塩化ナトリウムもしくは塩化カリウムが好ましく、またリン酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、炭酸水素緩衝剤のように広く知られ、当該技術分野で用いられている緩衝剤は、すべて本発明の方法に用いることができる。

当該技術分野で用いられ認められている方法、特に希釈法、ゲル排除法、透析、透析濾過などで外部のアンモニウムを有効に除去すると、このようにして形成された内部のアンモニウムの勾配によって、リボソームから中性のアンモニウムが直ちに放出されてリボソーム内にプロトンが蓄積され、その結果、リボソーム内の水性相が酸性になる。硫酸アンモニウムが解離した後、リボソーム

内に残った水素イオンもしくは硫酸イオンは、高品質の脂質を用いた場合、容易には漏出ししない。さらに、適正な試験条件が満たされれば、アンモニウムの勾配は少なくとも2週間以上安定である。

この方法には、いくつもの利点がある。第1に、0.55~0.00055Mの硫酸アンモニウムを含有する溶液に、硫酸アンモニウムと、塩化ナトリウムもしくは塩化カリウムのような塩または炭酸、炭酸水素もしくはリン酸の緩衝液とを異なる比率で含有する溶液で、硫酸アンモニウムによるリボソーム懸濁液を希釈することによって、前記勾配の大きさを制御できることである。このことは第1図に示してある。希釈度によって、0~4 pH単位の範囲でpHの勾配を得ることができる。リボソームからの NH_4^+ イオンの流出は、 NH_4^+ の勾配によって決まる。勾配が大きい程、pHは低くなり、 NH_4^+ イオンの流出が速くなり、リボソームに充填されるべき分子の流入が速くなる。硫酸アンモニウムリボソーム：塩の比を操作することによって、0.25 pH単位のような小さな勾配の変化または3~4のpH

単位のような大きな勾配の変化を得ることができる。あるいは、このシステムは、0.01~1 M、好ましくは0.05~0.15 Mの範囲のより高いモル濃度もしくはより低いモル濃度の硫酸アンモニウム溶液中のリボソームを用いることによって、より大きいもしくはより小さいアンモニウム勾配を得ることができ、その結果、より大きいもしくはより小さいpH勾配が得られる。

(以下余白)

上記の方法は、リボソームの製造法とは別個のものである。したがって、リボソームは、脂質膜が薄いか厚いかにかかわらず(薄い脂質膜が好ましい)、脂質の水和を含む溶媒注入法、逆相蒸発法、凍結乾燥、または凍結と解凍とを繰り返すことによって、多重ラメラ小胞(MLV)として作製することができる。この方法は、小さな単ラメラ小胞(SUV)、すなわち音波処理；フレンチ圧力セルを用いてMLVを高圧下で小さな穴を通過させる処理；エーテル類またはアルコール類のような溶媒を用いる溶媒注入法によって製造される小さなリボソームを得るのに、同様にうまく適用しかつ同様に利用できる。同様に、この方法は、透析、カラムクロマトグラフィー、バイオ・ビーズSM-2(bio-beads SM-2)、逆相蒸発法(REV)を用いて界面活性剤を除去するか、または高圧押出によって中間の大きさの単ラメラ小胞を形成させることによって製造される大きな単ラメラ小胞(LUV)、安定な多ラメラ小胞(stable plurilamellar vesicle (SPLV))もしくはオリゴラメラ小胞(OLV)を得

特開平2-196713 (8)

るために適用される (Methods in Biochemical Analysis, 33:337 (1988)). 当該技術分野で知られている、これらおよび他のリボソーム製造法は、本発明を実施するのに有用である。これらの方法は、米国特許第4,235,871号、第4,241,046号、第4,529,561号、第4,737,323号、および第4,752,425号に開示されており、これらの特許は、本願に援用する。

本発明の方法を用いてリボソームに充填できる薬剤は、弱塩基性もしくは弱酸性の部分を含むすべての弱い両親媒性化合物であり、数ある中で次のようなものが含まれる。すなわち、ドキソルビシン、エビルビシン、ダウノルビシン、カルシノマイシン、N-アセチルアドリアマイシン、リビダグゾン、5-イミドダウノマイシン、N-アセチルダウノマイシン、すべてのアントラシリン薬剤、ダウノリリン、プロブラノロール、ペンタミジン、ジブカイン、テトラカイン、プロカイン、クロルプロマジン、ヒンブラスチン、ピンクリスチン、マイトマイシンC、ピロカルピン、フィゾスチグ

ミン、ネオスチグミン、クロロキン、アモジアキン、クロログアニド、プリマキン、メフロキン、キニーネ、ブリジノル、プロジピン、ベンズトロピン・メシルレート、塩酸トリヘキシフェニジル、プロブラノール、チモロール、ピンドロール、キナクリン、ベナドリル、プロメタジン、ドパミン、セロトニン、エビネフリン、コデイン、メペリジン、メタドン、モルフィン、アトロピン、デシクロミン、メチキセン、プロバンテリン、イミプラミン、アミトリプチリン、デキセビン、デシプラミン、キニジン、プロブラノロール、リドカイン、クロルプロマジン、プロメタジン、ペルフェナジン、アクリジン・オレンジ、プロスタグランジン、フルオレセイン、カルボキシフルオレセイン、およびこれらの化合物に類似の他の分子である。

pHによる充填法は、過去に発表されているが、本発明の新規なシステムは、他の方法に対して、いくつかの独特の利点がある。簡単なリボソームの希釈によって前記勾配を容易に制御する性能は、独特の利点であるが、この種の薬剤放出システム

の新規な特徴である。充填率は予想可能であり、達成される最終の薬剤濃度は、充填される物質のpK値と、薬剤の化学的修飾によって改変できるその脂質/水分配係数から測定されるその疎水性とによって決まる。本発明の薬剤充填法は、迅速かつ容易で高性能の装置や特別な化学薬品を必要とせず、すなわち2種の緩衝液さえも必要としない。

過去に用いられた他の類似のシステムを凌駕する主要な進歩性は、リボソームを充填前に、その内面だけを、ごく短時間、低pHに暴露し、次いで充填と放出とを37℃で行うことができるという方法でアンモニウムの勾配を形成することである。このことは、リボソームの外部環境が変化すると、アンモニアが漏出し、内部水性相のpHが低下するが、外部水性相のpHは変化しないということに起因している。薬剤を充填中、特に充填開始時、薬剤が急激に流入すると、pHが部分的に急速に上昇し、そのためリボソームの低pHへの曝露が低下する。このことは、脂質小胞の安定性にとっては重要な結果である。その理由は、リン脂質類を酸性

の低pHに、長時間、曝露すると、その分解をもたらすからである。

本発明の他の重要な特徴は、リボソーム薬剤が安定なことである。本発明のシステムを用い、リボソームの脂質組成物を設計することによって、リボソーム薬剤の安定性は著しく改善される。これは、薬剤の充填と放出とを37℃で行うことによるものである。このことは非常に重要である。なぜならば、4℃で数週間もの間にわたる貯蔵中に、薬剤がごく低い速度でしか漏出しないということが見出されたからである。他方、高温の約50℃では、薬剤がかなり漏出した。また、薬剤のリボソームからの漏出は、リボソームの脂質組成物に依存し、EPC/コレステロールの製剤は、例えばDPPC/コレステロール小胞よりも大きな速度で漏出する。これらの結果を表4に示す。リボソームからの漏出速度は、使用するリン脂質の選択と、コレステロールのレベルとによって制御することができる。例えば、転移温度が56℃のDSPCを添加すると、広範囲の温度にわたって漏出による放出が減

少する。DPPGは両親媒性薬剤と特定の複合体を形成するが、これを添加すると、やはり異なる放出速度が得られる。

本発明のシステムの表1に示す他の重要な利点は、非常に多量の薬剤を、リボソーム内に、イオン透過担体を添加したり、それが存在することなしで、充填する性能である。このシステムは、3単位より大きいpH勾配をほとんど瞬間的に自ら形成するので、弱塩基が、少なくとも1:1000の比率で小胞の内部と外部とに分配されている。というのは、この分配は、外部と内部とにおける NH_4^+ の比率に対して1次で依存しているからである。この比率は、充填中の薬剤の濃度と、水溶液中の薬剤の溶解度とに依存している。外部媒体中の薬剤の濃度を最適化し、最初の充填封入時に高濃度のアンモニウムを封入する方法でアンモニウムリボソームを製造することによって、充填効率をほとんど100%に到達させることができる。この場合、リボソーム中の薬剤/脂質の比は、薬剤が過剰に存在している場合より低い。

ホリビド類は、完全に飽和されていてもよく、または一部が水素化されていてもよい。これらは天然産でも合成品でもよい。

本願で用いられる「糖脂質」という用語には、2つの脂肪酸鎖を有し、その1つがスフィンゴシンの炭化水素鎖であり、さらに1つまたはそれ以上の糖残基を有するような脂質類が含まれる。本発明を実施するのに適切な糖脂質類の例には、セレブロシド類、ガラクトセレブロシド類、グリコセレブロシド類、スフィンゴミエリン類、GM₁、スルファチド類、および極性基を持つ頭部として二糖類や三糖類を有するスフィンゴリビド類、すなわちジヘキソシド類およびトリヘキソシド類が含まれる。

本願で用いられる「ポリエチレンオキシド類」という用語は、エチレンオキシドを重合させることによって製造される分子量が500~20,000のポリエーテル類を意味する。その代表的なものは、ポリエチレングリコールである。これらポリエチレンオキシド類、好ましくはグリコール類は、他

特開平2-196713 (9)

本発明のシステムで利用できるリボソームは、種々の小胞形成脂質で製造される。その脂質としては、リン脂質類のような二脂肪酸鎖脂質類：ジグリセリド類；二脂肪酸糖脂質：スフィンゴミエリンやグリコスフィンゴリビドのような単一脂質類；コレステロールおよびその誘導体が挙げられ、これらの単独もしくは組み合わせ、および/またはリボソームメンブラン硬化剤を用いるか、もしくは用いずに利用される。

本願で定義される「リン脂質類」には、ホスファチジン酸(PA)とホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジリンシトール(PI)、ホスファチジルセリン(PS)、プラスマローゲン類、ジバルミトイルホスファチジルコリン(DPSC)のようなホスファチジルコリンリビド誘導体、卵ホスファチジルコリン(EPC)、部分水素化卵ホスファチジルコリン(PHEPC)、ジステアリルホスファチジルコリン(DSPC)、ホスファチジルグリセロール(PG)などが含まれる。これらのホス

の脂質類、特にリン脂質類と結合するのに適切で、いわゆるPEGリボソーム類を形成する。これらのリボソームからなるメンブランは、リン脂質リボソーム類だけで製造されたメンブランとは異なる性質を持っている。ホスファチジルのシステムは、薬剤をこれらのリボソーム類に充填するのに特に適切である。

大部分の小胞形成脂質類を形成するのに好ましい、リン脂質類のような二脂肪酸鎖の脂質類では、その脂肪酸鎖は、長さが少なくとも約12個の原子のものが好ましく、最適なのは、約15~24個の原子からなる長さのものである。この類は部分的もしくは実質的に飽和されていてもよく、また後者の場合は、各鎖が多くても1つの不飽和結合を持っているにすぎないことを意味する。飽和脂肪酸鎖によって、リボソーム内に、より良好な脂質の充填が起こり、その結果、酸化的/過酸化的な脂質の損傷をなくすことにより、リボソーム処方物の安定性を顕著に拡大する。このような酸化物損傷がないことは、トコフェロール、ブチル化ヒド

特開平2-196713 (10)

ロキシトルエン(BHT),もしくはビタミンEのような脂質親和性の遊離基捕獲剤が存在しない場合でも認められ、これらと他の脂質保護剤は、有効量で任意に添加することができる。同様に、ステロイドタイプの脂質類をリボソーム類に含める場合は、コレステロールおよびその類似物のような飽和物が好ましい。

本発明のリボソーム組成物を製造するのに用いる脂質は、電荷を持っていたり、中性であってもよい。リボソーム組成物の保持を促進するには、全リボソームの表面が負に帯電しているのが好ましいので、中性もしくは負に帯電した脂質が好ましい。

本発明の処方物に用いるのに好ましいEPC, DPPG, DPPC, PHEPC, およびDSPCは、 $C_{12} \sim C_{22}$, 好ましくは $C_{18} \sim C_{22}$ の各種鎖長の、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸とのほぼ同量ずつで構成されている。脂質の酸化を減少させるために、使用時には、主として多不飽和脂肪酸を水素化してモノ不飽和脂肪酸にする。

リボソームの調製

MLV, LUV, OLV, SUV, FTHLV およびSPLVのリボソーム類を調製した。これらはすべて、リン脂質類(PL), 好ましくはEPC, DPPC, DSPC, DSPGおよびPHEPCと、コレステロールと(PL/CHOL; 2/1; モル/モル), 必要に応じて加えられた1~10モル%のPEGとで構成されている。MLVは, Chem. Phys. Lipids, 1巻, 225~246頁, 1967年とMethods in Biochem. Anal., 33巻, 337~462頁, 1988年, とに記載されている薄層水和法で調製した。SPLVは, Biochemistry, 24巻, 2833~2842頁, 1985年にしたがって, ジエチルエーテルのような有機溶媒中で実施される脂質水和法で調製した。鉄イオンの影響またはドキシソルビシンの分解および脂質の過酸化を最少にするために, 0.5 mMのデスフェラルが, 米国特許第4,797,285号(本願に援用される)に記載の手順にしたがって, リボソーム調製に用いられる全水溶液に添加される。PEG-PL, MLV, OLV, SUV, SPLV もしくはFTHLVを含むすべてのタイプのリボソーム類が, この発明の範

リボソーム組成物は, さらに, コレステロール, コレステリル・ヘミスクシネート, コレステリル sulfेट, コレステリル, およびコレステロールの他の誘導体を含有していてもよい。リボソーム組成物は, さらに, 少量の脂肪アルコール, 脂肪酸, および/またはコレステロールエステル類, あるいは他の薬学的に容認可能であって, 表面電荷, メンブランの流動性に影響しかつ薬剤のリボソームへの取込みを増大させる賦形剤を含有させて処方してもよい。

(以下余白)

囲内にあると考えられる。リボソームは, アンモニウム溶液の存在下, 適切な方法で調製するか, またはアンモニウムなしで予め作っておいて, 次にアンモニウム溶液に入れてまたはそのような環境下において調製される。あるいは, アンモニウムを, 適切な封入法を用いて, リボソームに封入してもよい。

リボソーム内 NH_4^+ 分配の作成

リボソームは, リボソームの調製に一般に用いられているいずれの方法でも調製することができる。一般に, リボソーム調製に選択された脂質成分が1種以上存在する場合には, 例えばホスファチジルコリンとコレステロールの2:1の比率のような最適の比率でこれらを混合し, 有機溶媒に溶解させ, 室温でエバポレートして乾固させる。上記有機溶媒には, 例えば, ジクロロメタン, 四塩化炭素, 塩化エチレン, メチルクロロホルム, ベンゼン, トルエン, 塩化エチル, 塩化イソプロピル, クロロベンゼン, ブロモベンゼン, フルオロベンゼンなどがあり, 好ましくはクロロホルム

が用いられる。pHを生成する系もしくは化合物、例えば硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、水酸化アンモニウムなどを、リボソーム内に適切な内部pHを生じさせる量で、残留物である薄い脂質フィルムに加え、次いで、デスフェラルまたは他のキレート化剤と、他の水溶性抗酸化剤（例えば、可溶性ビタミンE、ビタミンC、グルタチオン、尿酸）とを安定化のために加える。あるいは、通常用いられる親油性抗酸化剤がリボソーム形成中にリボソーム膜に組込まれ、これが過酸化損傷に対する保護剤として働く。上記抗酸化剤としては、例えばブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、ブチル化ヒドロキシアセトン(BHA)、 α -トコフェロール、 α -トコフェロールスクシナート、およびプロビルガラートがある。MLV、SUV、LUV、OLV、SPLV、PTMLVなどのようなリボソーム類は、押出し法または音波処理、均質化法などのようなその外の適切な方法で調製される。

硫酸アンモニウムリボソームの内部pH

る。実施例4の校正曲線は、リボソームの外部媒体のpHを7.5の一定に保持し、リボソーム小胞内のpHを5.0~7.5の範囲で変化させて作製した。曲線の左のシフトは、小胞の外表面に静電的に結合した少量のビラニン染料によるものである。この校正曲線は、溶液を希釈して硫酸アンモニウム：塩化カリウムの比率を低下させた場合の、硫酸アンモニウムリボソームの内部pHの変化を定量するのに用いた。硫酸アンモニウムの濃度の外側：内側の種々の比率は、外側硫酸アンモニウムを種々の塩で希釈して形成した。

硫酸アンモニウムリボソーム内に封入されたビラニンの蛍光強度の変化を、硫酸アンモニウムの外部対内部の濃度の比率として第1図に示す。第1図は、硫酸アンモニウムの外部／内部の濃度の比率を低下させると内部のpHが下がることを示している。ビラニンを充填したリボソームを、pH7.5の0.15M塩化カリウムで予め平衡化したセファデックスG-50カラムを通過させた後に、ビラニンの蛍光は、リボソームの内部pHの変化が少なくとも

特開平2-196713 (11)

例えば0.15MのNaClもしくはKCl溶液のような種々のイソオスミック塩の溶液で予め平衡化したセファデックスG-50に、リボソームを含有する硫酸アンモニウムを通過させて、外側の硫酸アンモニウムのすべてもしくは一部を有効に除去し塩化ナトリウムまたは塩化カリウムで置換する。その結果、リボソームの内側と外側との間に硫酸アンモニウムの勾配が生成する。中性のアモニア(NH₃)はこのリボソーム膜を自由に通過できるので、pHの勾配は、このようにして形成され、内部水性相が外部よりも酸性になる。その原理を実施例1~4で説明する。

pH勾配の存在を証明するために、リボソームの内部pHを測定する2つの別々の測定法が用いられた。まず、ビラニン(8-ヒドロキシ-1,3,6-ピレントリスルホン酸)をリボソーム内に封入して、その蛍光強度を実施例4にしたがって測定した。ビラニンの蛍光強度はpH依存性である。なぜなら、pK=7.2のビラニン分子の8-ヒドロキシ基を滴定するとその吸光係数が明らかに変化するからであ

3単位であることを示している。曲線の矢印は、第1図への挿入図からの硫酸アンモニウムリボソームの内部pHを示す。挿入したグラフは、リボソームに封入されたビラニンの蛍光とリボソームの内部pHとの関係を示す校正曲線である。さらにアンモニウムの勾配の存在を実証するために、アクリジンオレンジのような他の化合物を使って上記したのと同じ試験を繰返した。細胞毒性薬剤のアクリジンオレンジは両親媒性の弱塩基(pK=9.25)であり、蛍光を発する長所がある。硫酸アンモニウムリボソーム内にビラニンを封入する代わりに、アクリジンオレンジを含有する溶液にリボソームを添加した。リボソームの水性相に分配し、実施例5に記載の試験計画を利用して、上記の溶液の消光状態を監視し、第2図に示した。

第2図は、リボソームの内側と外側との間の硫酸アンモニウムの勾配の、アクリジンオレンジの蛍光の消光に対する影響を示す。挿入グラフは、試験の一例である。アクリジンオレンジの蛍光強度(F.I.)の百分率を連続的に監視し(a)として

特開平2-196713 (12)

示す。所定の時間(b)において、リボソームを添加し消光を追跡した。定常状態で、 $5\mu\text{m}$ のナイジェリシンを添加し(c)で示す。消光の解除(release)の度合を、蛍光強度に依存する硫酸アンモニウム勾配を計算するのに用いた。試験の詳細は実施例5に示す。

外部の硫酸アンモニウムが除去されたリボソームでは、アクリジン オレンジは96.5%消光し、これはリボソーム内部の水性区画が大きく酸性化していることを示している。

リボソームのドキソルビシンによる充填

ドキソルビシンは、いくつかの物理特性がアクリジン オレンジに類似した両親媒性薬物である。それはアミノ基を有する両親媒性の弱塩基である($\text{pK}=8.25$)。従って、この薬物は、リボソームの内側と外側との間に生じたpH勾配によって、リボソームの内部水性区画にドキソルビシンを充填させる。アクリジン オレンジと類似の性質を有する。この薬物を充填させるために、実施例1~3により形成された硫酸アンモニウムリボソーム

を、 0.15M 塩化ナトリウム溶液で予め平衡化したセフデックスG-50カラムを通過させてpH勾配を作り、実施例1C~3Cの方法により、生理食塩水-デスフェラルによるドキソルビシン溶液に添加した。薬物取込みの動力学を、第3図に示す。リボソームの2つの製剤を用いた。その一方は、2:1のモル比のEPCおよびコレステロールにより構成され、2番目は、2:1のモル比のDPPCおよびコレステロールにより構成される。

第3図は、ドキソルビシンの硫酸アンモニウムリボソームへの充填の動力学を示す。この充填は、封入されていない外側の硫酸アンモニウムを、セフデックスG-50ゲル排除クロマトグラフィで除いた後に開始した。ドキソルビシンは、EPC/コレステロール・リボソームとともに 25°C で所定時間インキュベートし(—○—○—で示す)、あるいは別個にDPPC/コレステロール・リボソームとともに 50°C で所定時間インキュベートした(---□---□---で示す)。加温終了後、取込まれていないドキソルビシンをダウエックス50Wカラ

ムに吸着させて除去し、次いでリン脂質および薬物の濃度を測定してドキソルビシン/脂質比を計算するのに用いた。

遊離の封入されていないドキソルビシン(DXR)を、カチオン交換樹脂ダウエックス5WX-4(200~400メッシュ)を用いてリボソーム・ドキソルビシン製剤から除去した。上記の樹脂は、Biochem. Biophys. Acta, 818巻, 343-351頁, 1985年に記載の方法を若干改変した方法によってそのナトリウム塩の形で調製した。得られたダウエックス樹脂をリボソーム・ドキソルビシン製剤に添加し、室温で20分間ゆるやかに振盪した。上記保期間中、正に帯電した遊離のドキソルビシンはこのダウエックス樹脂に結合し、一方封入されたドキソルビシンは、負に帯電したリボソームと結合して残る。ダウエックス樹脂は、混合物を、 $5.0\mu\text{m}$ のナルジェン(Nalgene)濾過用漏斗(ナルゲ社(Nalge Company), 米国, ニューヨーク州, ロチェスター)で減圧濾過することによってリボソーム・ドキソルビシンから除去された。ダウエックス樹脂はデス

フェラルに結合するので、ダウエックス樹脂で遊離の薬物を除去した後、直ちに 0.5mM の最終濃度でデスフェラルを添加した。

第3図からわかるように、上記のプロセスは、最初の1時間の速い相と、その後の遅い相との2相で構成され、後者の相は約24時間続く。DPPC/コレステロール・リボソームに取込まれた薬物の量は、EPC/コレステロール・リボソームに取込まれた量の2倍であった。内外のpH勾配をもたない硫酸アンモニウムリボソームは、使用した特定の脂質の分配係数と利用しうる内部体積とから予想される程度にしか薬物を取込まなかった。最終の比率は脂質の濃度に依存していた。

疎水性の度合の充填に対する影響

例えばアクリジンの誘導体のようなその他の両親媒性弱塩基は、pH勾配にตอบสนองして、リボソームの内部水性相に、ドキソルビシンより著しく速く分配される。ダウノルビシンは、水酸基を欠いたドキソルビシンの同族体であり、従って、ドキソルビシンよりも疎水性であるが、ダウノルビシン

特開平2-196713 (13)

を充填したリボソームは、試験条件下で、上記の傾向を有することが証明された。ダウノルビシン取込みの速度はドキソルビシンより高かったが、これは恐らくダウノルビシンの疎水性が約10倍高いことによるものであり、その取込みは1時間未満で完了した。

リボソーム内のドキソルビシンの濃度

リボソーム内に充填された薬物の濃度を測定するために、小胞の内部の水性浸透体積を測定した。この測定は、非測定的 (non-measurable) 放射性トレーサー³Hイヌリンを封入して行った。補足されなかったイヌリン除去の前後のリン脂質1モルあたりの放射能を比較し、これを、個々の実施例に記載された方法を用いて、封入体積 (trapped volume) を測定するのに利用した。得られたデータから、2つの製剤、すなわち EPC/コレステロールおよび DPPC/コレステロールの小胞の内部体積を計算して表1に要約した。DPPC/コレステロール製剤の内部封入体積は、EPC/コレステロール製剤のほとんど2倍 (つまり、後者の 1.5ml/

モルに対して 2.7ml/モル) であった。これは、表1に示すように、これら2つのリボソームの集団間の大きさの差と良好な相関関係を有している。また、これら2つの製剤中のドキソルビシンの計算平衡濃度を表1に示す。2つの製剤の内部のドキソルビシン濃度は、リボソームの大きさに差があるにもかかわらず、ほとんど同一であるが、先に述べた脂質比に対する薬物の差異を説明している。2種の小胞中のドキソルビシンの濃度が同一であるということは、システムがその限界に達していることを示唆している。

リボソーム内でのドキソルビシンの凝集

リボソームへの薬物、の充填に際して出合うことが多い問題の一つは、充填に限界があるということがあり、すなわち薬物のある量しか充填できず、その限界に達したならば、薬物はリボソーム内で凝集体を形成することが多い。このことは、ドキソルビシンで最もよく示すことができる。

約1 μ M より高い濃度では、ドキソルビシンは二量体を形成し、高分子量の凝集体になるという

ことは、すでにBiochemistry, 21巻, 3927~3932頁, 1982年に記載されている。硫酸アンモニウムリボソーム内で達成される濃度はこの限界をはるかに超えるので、この薬物の小胞内での物理的状態を研究した。凝集によって変化する最も単純なパラメータは、薬物の吸光スペクトルである。470nmの吸光度:550nmの吸光度の比率は、この薬物の凝集状態の半定量的なパラメータを提供することができる。表2に、ドキソルビシンの高濃度溶液についての上記の比率と、ドキソルビシンが充填されたリボソームからの同じパラメータについてのデータを示す。測定はパーキン・エルマー13B型デュアルビーム分光光度系で実施した。リボソーム内の上記比率により、同じ脂質組成を用い同じ方法で対照用に作製した“空”のリボソームすなわちドキソルビシンを含有していないリボソームでは異なるスペクトルが得られた。この方法を用いて、リボソームの光の散乱が修正された。両方の場合において、薬物がかなり凝集していることがデータから推測することができる。しかし、

このような凝集は、ドキソルビシンのリボソームからの放出に全く悪影響を与えない。

封入されたドキソルビシンの蛍光の研究を、溶液中の遊離のドキソルビシンの蛍光強度を、リボソームに封入された薬物の蛍光強度と平行してその濃度の関数として研究することによって実施した。測定は、パーキン・エルマーMPF-44分光蛍光計で、励起/発光波長の470nmと590nmとを用いて行った。ドキソルビシンは、表3に示す濃度まで生理食塩水で希釈した。薬物の蛍光は、約 10^{-5} Mより高い濃度では消光することがわかった。この試験は、各濃度ごとの蛍光と、同じ溶液の 10^{-5} Mより低い濃度に希釈したものの蛍光を比較して行った。溶液の自己消光の研究には、内部フィルター効果の問題がある。表3でわかるように、リボソーム内のドキソルビシンの蛍光は、ほとんど100%消光される。これは、実施例1~4で作製したリボソームの蛍光と、0.75M HClを10%含有するイソプロパノールで10倍に希釈した後の同じ混合物の蛍光との差から算出した。このような溶

特開平2-196713 (14)

液は、リボソームを完全に可溶化するので、ドキソルビシンの濃度は 10^4 倍以上希釈される。水中および酸性イソプロパノール溶液中でのドキソルビシンの蛍光の差の修正を、これら2つの溶液における“遊離”の薬物の蛍光の測定値から推測して行った。少量の消光されていないドキソルビシンは、恐らく、小胞から漏出したいくらかの遊離の薬物によるものである。

ドキソルビシンのリボソームからの漏出

この発明の重要な態様のひとつは、薬物のリボソームからの漏出である。この漏出は、速くて制御できない場合または非常に遅い場合には、リボソームの薬物封入によって得られた利点を完全に打消してしまう場合がある。他方、この漏出を、時間的に制御して時間的に放出ができれば、組織に対する薬物の放出において大きな利点と改良とを達成することができる。

ドキソルビシンの蛍光の自己消光性によって、リボソームからのドキソルビシンの漏出を測定する直接的で容易な方法が提供される。蛍光強度の

増大（これはデクエンチング (dequenching) の影響である）を監視することによって、実施例6の方法に従って、放出された薬物の正確な量を監視することができる。取込まれていないドキソルビシンを除去すると薬物の強い勾配が生成するので、ある程度の漏出は推定されることがわかるであろう。

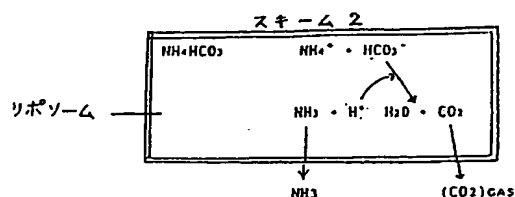
表4および第4図は、前記2つのタイプのリボソームからの漏出速度に関するデータを示す。第4図はリボソームからのドキソルビシンの漏出を示す。この図は、膜に結合したドキソルビシンまたは水性相に封入されたドキソルビシンを有する、リボソームからの漏出を比較している。水性相に封入されたドキソルビシンを有するリボソームは、DPPC/ コレステロール (---) およびEPC/ コレステロール (----) のリボソームを用いて、実施例に記載されている硫酸アンモニウム充填法で調製した。膜に結合したタイプのリボソームは、(7/3/4 ; モル/モル/モル) の比率のEPC/EPG/コレステロールで構成され、痕跡量の

2H- コレステアリルリノレートを含有している。
リボソーム (CO₂ 発生体) 内のアンモニウム勾配

本発明はまた、気体、特にCO₂を超音波影像化用のハイパーエコージェニックエンハンサー (hyperechogenic enhancer) として発生させるのに有用である。その方法と結果を実施例9および第5図に示す。

CO₂はハイパーエコージェニックであるので超音波影像化用のエンハンサーとして作用する。CO₂が入る標的器官に形成することは、今まで困難であった。この発明を利用する方法は、超音波影像化法で診断すべきヒトの標的組織に、例えば炭酸水素アンモニウムを封入したリボソームのようなアンモニウムリボソームを投与する方法である。そのリボソーム内で、炭酸水素アンモニウムは、アンモニウムカチオンと炭酸水素アニオンとに解離し、前者のカチオンはさらに遊離水素のプロトンと中性のアンモニアとに解離し、後者のアニオンは水と二酸化炭素とに解離する。次いで二酸化炭素と中性アンモニアは、アンモニウム勾配によ

りリボソーム膜を透過する。このようにして、アンモニウムリボソームは、第5図に示すに、組織内で二酸化炭素発生体として作用する。そのプロセスをスキーム2に示す。



この方法の主な長所は、リボソームが一定の組織を目標に定めることが可能であり、またCO₂放出のプロセスが正しい時期わく内にあれば、リボソームが到達しうる器官と組織の適切な影像エンハンサーになるということである。実際に、リボソームの水性区画を、アンモニウム勾配によって酸性にすると、リボソーム内に封入されたNH₄HCO₃からCO₂ガスが発生する。NH₄HCO₃は、リボソームを酸性にするのに用いられ、またCO₂源として利用される。この態様は、超音波影像の強化だけ

特開平2-196713 (15)

でなく、ガスや他の化合物を制御して遠隔放出させることを要しかつ通常の技術では近づけない部位を意のままに酸性化する必要がある他のシステムにも用いることができる。

以下の実施例は、本発明の新規な方法を形成し利用する方法を示すが、本発明の範囲を限定するものではない。

有用性

本発明のシステムの主な有用性は、リボソームを充填前のごく短時間だけその内表面のみ、低いpHに暴露しその結果充填と放出を37℃で行うことができるという方法で、2つの系(pHおよびアンモニウム)の勾配の示すを形成することによって、両親媒性薬物を容易にかつ効率的に、リボソームに充填し、またリボソームから放出することである。充填および/または放出の速度は、勾配を変えることによって容易に操作することができる。このシステムは生理学的に受容可能でかつ非毒性であり、また両親媒性薬物を、その場でリボソームに充填するのに適しており、例えば、血液循環

系から過剰投与量の両親媒性化合物を除去したりまたは診断映像化のためにその場でCO₂の集中を起こさせるのに有用である。リボソームの低pHに対する短時間の暴露は、十分に許容できることであり、その結果、リボソームが低い酸性のpHに長期間暴露されてリン脂質が分解するに至る場合に比べて、脂質の分解するに至る場合に比べて、脂質小胞の安定性が大きく改良される。pH勾配による効率的な薬物充填は、適正に作製した脂質組成物と、両親媒性薬物のリボソームからの所望の放出速度とで達成されるので上記のことは特に重要である。硫酸アンモニウムのリボソームは、マウスに投与された時に非毒性であることが見出され、毒性の徴候または毒性に起因する死亡を示さなかった。

(以下余白)

材料

脂質類：卵ホスファチジルコリン(EPC)はAvanti Polar Lipids社(米国、アラバマ州、バーミングハム)から購入し；95%EPCはアサヒ社(日本)から購入し；コレステロールはSigma社(米国、ミズーリ州、セントルイス)から入手し；ドキソルビシンはCarlo Erba社(イタリア、ミラノ)から入手した。

pH指示薬：ピラニン(8-ヒドロキシビレン-1,3,6-トリスルホナート)はMolecular Probes社(米国、オレゴン州、オイゲン)から購入し；アクリジンオレンジはAldrich社から購入した。

ナイジェリシンはCalbiochem社(米国、カリフォルニア州、マウンテンビュー)から購入し、ダウノルビシンはSigma社から入手し、 α -トコフェロールスクシナートとDL- α -トコフェロール、セファデックスG-50、セファロース6B(Pharmacia社製)およびダウエックス50WX-4(200~400メッシュ)(Dow Chemical社製)はSigma社から入手した。デスフェロキサミンメシル酸(デスフェ

ラル)はCiba Geigy社(スイス、バーゼル)から入手し、ポリカーボネートフィルターはNucleopore社(米国、カリフォルニア州、アレザントン)から入手した。

実施例1

NH₄⁺勾配を有するEPC/コレステロールリボソームの調製

この実施例は、1.0より小さい、内側から外側への硫酸アンモニウム勾配を有するEPC/コレステロールリボソームの調製と、これらリボソームへの薬剤の充填を例示する。

A. リボソームの調製

5 mlのクロロホルムに溶解した100mgのEPCを丸底フラスコに注入し、次いで25mgのコレステロールを添加した。減圧下でフラッシュエバポレータを用いてクロロホルムを蒸発、乾固させた。フラスコの表面に生成した薄い脂質フィルムに、0.5 mMのデスフェラルを含有する0.11M硫酸アンモニウムの水溶液5 mlを添加し、約30分間激しく振盪して、上記脂質を上記溶液中に分散させた。得ら

特開平2-196713 (16)

れた多重ラメラ小胞 (MLV) を、Millipore 濾過装置で、アルゴンガスによる150psiの圧力下、ステンレススチール製の押出しセルを用いて、 $0.4\mu\text{m}$ のNucleopore社のポリカーボネートフィルターを通して3回、および $0.2\mu\text{m}$ のポリカーボネートフィルターを通して3回押出した。この全工程は室温で実施した。1985年12月6日に出願された米国特許出願第806,084号(参考文献として本願に示されている)に記載の方法に従って、劣化過程に対して脂質類とドキソルビシンを保護するために、デスフェラルを添加した。

生成されたMLVは、直接使用してMLVと呼称されるか、またはさらに加工され、凍結と解凍(freezing and thawing)によってFTMLVを提供するか、もしくは押出しによって押出しオリゴメラ小胞 (OLV) を提供する。

FTMLVは、Biochim. Biophys. Acta, 817巻, 193頁, 1985年にしたがって、液体空気と25℃の温度で凍結・解凍のサイクルを10回繰り返して上記のMLVから調製された。

することによって調製された。すべての小胞の洗浄は上記の硫酸アンモニウム溶液中で行った。

リボソームの大きさの分布を、Methods in Biochem. Anal., 33巻, 337-462頁, 1988年に従って、Malvern 4700自動測定システムを用い、準弾性光散乱法 (QELS) で測定した。

リボソームのタイプの、アンモニウム勾配に依存するドキソルビシンの充填に対する影響。表5では、3種の多重ラメラ小胞 (Avanti) EPC/コレステロールリボソームにドキソルビシンをアンモニウムイオンの勾配によって充填した場合の比較を示す。すべての場合において、硫酸アンモニウムを充填した後、リボソームをゲル排除クロマトグラフィーに付すことによってアンモニウムの勾配を得た。取り込まれたドキソルビシンを、室温下で24時間インキュベートした後、ダウエクスクス樹脂で除去し、ドキソルビシンのリン脂質類に対するモル比 (DXR/PL) を測定した。表5は、充填効率がSPLV>FTMLV>MLVの順であることを示している。この順位は、これら3種のMLVの封入

押出しOLVは、150psiのアルゴンガスの圧力を用いて、直径25mmの $0.4\mu\text{m}$ ポリカーボネートフィルターを通して3回、次いで直径25mmの $0.2\mu\text{m}$ ポリカーボネートフィルターを通して3回押出すことによって上記MLVから調製された。改良されたMillipore 限外濾過装置を上記の押出しに用いた。全押出し工程は30分間より短い時間で実施した。バスソニケーター (bath sonicator) (Transonic 4601H, 35KHz周波数, 285ワット, Elma Bergwies社, オーストリア) 内で10秒間、超音波にさらすと、押出されたOLVの品質と特性に影響を及ぼすことなく押出しが容易になる。

安定な多ラメラ小胞 (SPLV) は、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 75巻, 4194-4198頁, 1978年に記載の逆相蒸発小胞に関連するものである。SPLVは、Biochemistry, 24巻, 2833~2842頁, 1985年に記載されているのと同様にして、 0.5mM のデスフェラルを含有する 110mM の硫酸アンモニウム溶液を用いて、脂質が非常に高濃度で存在するエーテル/水の乳濁液からジエチルエーテルを除去

体積に関連している。MLVの方がSPLVもしくはFTMLVよりも漏出しやすいことは重要であり、後者の2種のMLVの方がよくアニールされていることを示唆している。

ドキソルビシンを充填したリボソームの安定性を、硫酸アンモニウム勾配法でドキソルビシンを充填した卵PC/コレステロールリボソームの物理的および化学的安定性を確認することによって測定した。DXRの漏出は温度依存性であり、その活性化エネルギーはかなり高い。物理的安定性の研究の第1段階は、表5に記載した3種の方法で製造されたMLVのDXR/リン脂質のモル比の変化を追跡することであった。

データから、4℃における漏出がリボソームの製造法に依存していることが明らかである。漏出速度に基づいた物理的安定性はFTMLV>SPLV>MLVの順である。漏出が一次の速度式に従うと仮定すると、流体の脂質 ($T_m < 37^\circ\text{C}$) からなるリボソームは、遠隔充填に用いられるのに最も適している。上記のデータは、これらリボソームの安定性につ

特開平2-196713 (17)

いての主な問題が、DXR とリン脂質類の化学的安定性ではなくて、DXR の漏出であることを示している。後者の問題は、高温での相転移点を有するリン脂質を用いれば、軽減し得る。

B. pH 勾配の生成

上記のようにして得たリボソームを、0.5mM のデスフェラルを含有する0.15M 塩化ナトリウム溶液で予め平衡化したセファデックスG-50のカラムにかけて、同じ溶液で溶出させた。大きな小胞 (MLV, SPLV および FMLV) の損失を減少させるために、小胞の分散液を、バスソニケーター中で10秒間、音波処理を行った。リボソームを含有する排除容積部を集めて次のステップCに用いた。

代わりに、小胞を上記のNaCl溶液で希釈して、リボソームと外部媒体間に所望の硫酸アンモニウム勾配を得た。例えば、0.15M 塩化ナトリウム溶液でリボソームを1,000倍に希釈して、内側から外側へ1から1,000の硫酸アンモニウム勾配を得た。

他の実験では、塩化ナトリウムの代わりに塩化

カリウムを用いた。

C. リボソームのドキシソルビシンによる充填

10mg/mlのドキシソルビシン塩酸の塩水-デスフェラル溶液1mlを、ステップBでリボソームをセファデックスG-50カラムでゲル濾過した後のリボソーム分散液1mlに添加した。混合物を室温で約24時間インキュベートした。このインキュベーション時間は、ある種の速度論的研究ではさらに短かった。インキュベーション期間終了後、混合物を、ダウエックス50WX-4 (Serva) のカラムを通過させ、遊離の取り込まれていない薬剤を吸着させた。60mgという少量の樹脂で、15分間より短い時間で1mgもの遊離のドキシソルビシンを吸着することができた。リボソームに取込まれたドキシソルビシンは、ダウエックス樹脂には全く吸着されずにリボソームに残った。乾燥重量が1~2gの樹脂を含有するカラムは、取込まれていない全薬剤を吸着するのに十分なものであった。取込まれた薬剤のリボソーム脂質に対する比を測定するために、リン脂質とドキシソルビシンの濃度を測定した。PC

濃度は、Anal. Biochem., 104巻, 10-14頁, 1980年の方法を、検定の有機相にドキシソルビシンが分配されるのを避けるため、20μlの10M HCl を検定混合物に添加するように改変して測定した。標準曲線を得るためにEPCを用いた。

ドキシソルビシンの濃度は、0.75M HCl 水溶液を10%含有するイソプロピルアルコールにリボソームを溶解した後に測定した。溶液の吸光度は、480nmの波長と、12600M⁻¹CM⁻¹という酸性イソプロピルアルコール中でのドキシソルビシンの吸光係数を用いて、Perkin Elmer λ3B UV/VIS デュアルビーム分光光度計で測定した。可溶化されたリボソームのRPPLCを用いて、J. Parent. Sci. Technol. 39巻, 220~224頁, 1985年に記載された方法にしたがってドキシソルビシンの完全性を評価した。

実施例2

NH₄⁺ 勾配を有するDPPC/コレステロールリボソームの調製

この実施例は、1.0より小さい外側から内側への硫酸アンモニウム勾配を有するジバシトイル

ホスファチジルコリン/コレステロールリボソームの調製と、これらのリボソームへの薬剤の充填を例示する。

A. リボソームの調製

5mlのクロロホルムに溶解した100mgのDPPCを丸底フラスコに注入し、25mgのコレステロールを加えた。フラッシュエバポレーターを用いて減圧下でクロロホルムを蒸発、乾固させた。フラスコの表面に生成した薄い脂質フィルムに、水に溶解した0.5mMのデスフェラルを含有する0.11M硫酸アンモニウムの溶液5mlを加えて、約30分間激しく振盪することによって上記脂質を上記の溶液に分散させた。得られたMLVを、Millipore 濾過装置で、アルゴンガスにらる150psiの圧力を用いて、0.4μmのポリカーボネートフィルターを通して3回、0.2μmのポリカーボネートフィルターを通して3回押出した。全工程は、リン脂質の転移温度より充分高い50℃で実施した。

B. pH 勾配の生成

上記のようにして得られたリボソームを、0.5mM

のデスフェラルを含有する0.15M 塩化ナトリウム溶液で予め平衡化したセファデックスG-50カラムにかけて、同じ溶液で溶出させた。リボソームを含有する排除容積部を集めて次のステップCに用いた。

代わりに、小胞を上記のNaCl溶液で希釈して、リボソームと外部媒体間に所望の硫酸アンモニウム勾配を得た。例えば、0.15M 塩化ナトリウム溶液でリボソームを1,000 倍に希釈することによって、外側から内側へ1から1,000 の硫酸アンモニウム勾配を得た。

他の実験では、塩化ナトリウムの代わりに0.15 M の塩化カリウムを用いた。

C. リボソームのドキソルビシンによる充填

塩水-デスフェラルに溶解したドキソルビシン塩酸の10mg/ml溶液1mlを、リボソームをセファデックスG-50カラムでゲル濾過した後のリボソーム分散液1mlに添加した。混合物を室温で約24時間インキュベートした。インキュベーション時間終了後、混合物を、ダウエックス50WX-4 (Serva)

5 mlのクロロホルムに溶解した95%品の卵ホスファチジルコリン (アサヒ社) 100 mgを丸底フラスコに注入し、次に25mgのコレステロールを加えた。フラッシュエバポレーターを用いて減圧下でクロロホルムを蒸発、乾固させた。フラスコの表面の薄い脂質フィルムに、水に溶解した0.5mM のデスフェラル (Ciba-Geigy社から入手) を含有する0.11M 硫酸アンモニウムの水溶液5mlを添加し、約30分間激しく振盪することによって上記脂質を溶液中に分散させた。得られたSPLVを、Millipore濾過装置で、アルゴンガスによる150psiの圧力下、のステンレススチール製の押し出しセルを用いて、0.4 μ m のポリカーボネートフィルターを通して3回、次に0.2 μ m のポリカーボネートフィルターを通して3回押し出した。全工程を室温で実施した。デスフェラルを添加した。

B. pH勾配の生成

上記のようにして得られたSPLVを、0.5mM のデスフェラルを含有する0.15M 塩化ナトリウム溶液で予め平衡化したセファデックスG-50カラムにか

カラムを通過させて、遊離の取り込まれていない薬剤を吸着させた。60mgの少量の樹脂で、15分間より短い時間で1mgもの遊離のドキソルビシンを吸着させることができるが、一方リボソームに取り込まれたドキソルビシンは、ダウエックス樹脂に全く吸着せず、リボソームに残っている。乾燥重量が1~2gの樹脂を含有するカラムは、取り込まれていない全薬剤を吸着するのに十分なものであった。取り込まれた薬剤のリボソーム脂質に対する比率を測定するために、リン脂質とドキソルビシンの濃度を実施例1に記載したのと同様にして測定した。

実施例3

NH₄⁺ 勾配を有する EPC/コレステロールリボソームの調製

この実施例は、1.0 より小さい、内側から外側への硫酸アンモニウム勾配を有する95% EPC/コレステロールリボソームの調製と、これらのリボソームへの薬剤の充填を例示する。

A. リボソームの調製

けて同じ溶液で溶出させた。リボソームを含有する排除容積部を集めてステップCに用いた。

代わりに、小胞を、上記NaCl溶液で希釈してリボソームと外部媒体間に、所望の硫酸アンモニウム勾配を得た。リボソームを、0.15M の塩化ナトリウム溶液で1,000 倍に希釈して、外側から内側へ1から1,000 の硫酸アンモニウム勾配を得た。

他の実験では、塩化ナトリウムの代わりに塩化カリウムを用いた。

C. リボソームのドキソルビシンによる充填

塩水-デスフェラルに溶解したドキソルビシン塩酸の10mg/ml溶液1mlを、リボソームをセファデックスG-50カラムでゲル濾過した後のリボソーム分散液1mlに添加した。混合物を約24時間室温でインキュベートした。このインキュベーション時間はある種の速度論の実験よりも短かった。インキュベーション時間経過後、混合物をダウエックス50WX-4カラムを通過させて遊離の薬剤を吸着させた。樹脂は、1mgもの遊離のドキソルビシンを15分間で吸着することができるが、一方隔離さ

れたリボソームに取り込まれたドキソルビシンはリボソームに残っている。乾燥重量が1~2gの樹脂を含有するカラムは、取り込まれていない全薬剤を吸着するのに十分なものであった。取り込まれた薬剤のリボソームの脂質に対する比率を測定するために、リン脂質とドキソルビシンの濃度を上で記載したのと同様にして測定した。

実施例4

硫酸アンモニウムを含有するリボソームへのビラニンの充填

この実施例は、硫酸アンモニウムを含有するリボソームへの、蛍光化合物であるビラニンの充填と、ビラニンの蛍光を測定することによるこれらリボソーム内部のpHの測定を例示する。

4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸(HEPES)緩衝剤を最終濃度10mM、pH 7.5で含有する水和溶液に0.5 μ Mのビラニン(8-ヒドロキシ-1,3,6-ピレントリルスルホナート)を含有させること以外、上記実施例2と同様にし、リボソームを調製した。0.5 mMデスフェラル

／520nmの励起／発光波長を用い、Perkin-Elmer LS-5蛍光分光計で測定した。校正曲線を第1図に示す。

実施例5

リボソームへのアクリジンオレンジの充填

この実施例は、リボソームへのアクリジンオレンジの充填を例示する。アクリジンオレンジはpK 9.25の両親媒性の弱塩基であり、その主な利点は蛍光性をもっていることである。

1 μ molのアクリジンオレンジを、塩化カリウムと硫酸アンモニウムとを異なる比率で含有する溶液に添加した。上記溶液は、リボソームを添加した時に、硫酸アンモニウムの種々の内外間の勾配が得られるように設計された。リボソームを200倍に希釈するように計算し、実施例2Aと同様にして調製した少量のリボソーム懸濁液を、キューベット内のアクリジンオレンジと混合し、Perkin-Elmer LS-5 蛍光分光計を用いて、蛍光の消光を連続してモニターした。この時、490nmの励起光と、小胞に取り込まれたアクリジンオレンジの量の指

特開平2-196713 (19)

とHEPES緩衝液を含有する0.11M硫酸アンモニウム溶液で予め平衡化したセファデックスG-50カラムでゲル濾過することによって、取込まれていないビラニンを除去した。酸性化するために、リボソームを、HEPESで緩衝された塩化カリウム溶液で予め平衡化されたセファデックスカラムを通過させるか、または硫酸アンモニウムと上記溶液との異なる比率の混合物で希釈して、硫酸アンモニウムの所望の外側／内側の比率を得た。小胞の内部のpHは、ビラニンの相対蛍光強度を測定することによって測定した。20mMの4-モルホリノエタンスルホン酸(MES)のpH 5と6の緩衝液と10mMのHEPES緩衝液との滴定で異なるpHに調節したリボソームの塩化ナトリウム溶液を調製することによって校正曲線を作成した。上記と同様にセファデックスカラムG-50を通過させて、外部pHを7.5に固定し内部のpHが異なる一連のリボソーム製剤を調製した。すべての場合、pH勾配と、内外のpHの平衡化の破壊は、最終濃度5 μ Mまでナイジェリシンを添加して行った。ビラニンの蛍光は、460

nmとして525nmの発光を用いた。平衡化した後、ナイジェリシンを添加し最終濃度5 μ Mとした。蛍光の回復をモニターした。ナイジェリシン添加の前後の蛍光の比率を用いて、次式によってアクリジンオレンジの蛍光の消光を計算した。

$$100 - \frac{F_0}{F_N} \times 100$$

ここでF₀は、消光のプラトーに到達した後で得られた蛍光であり、F_Nはナイジェリシン添加後に回復した蛍光強度である。消光はpH勾配の定性的指標として役立つ。結果を第2図に要約して示す。

実施例6

ドキソルビシンのリボソームからの漏出の速度論

ドキソルビシン含有のリボソームを、実施例1Aもしくは2Aのそれぞれと正確に同じにして調製した。得られたリボソームを塩水で1,000倍に希釈し、混合物の蛍光を、22℃と49℃の制御された温度条件下で、Perkin Elmer MPF-44 蛍光分光計で連続的にモニターした。すべての場合に、連

特開平2-196713 (20)

続して直線的に螢光が増大するのが認められた。各実験後、リボソームを、0.75M HCl水溶液を10%含有するイソプロピルアルコールで10倍に希釈した。上記溶液ではリボソームが完全に溶解し、消光が起こらない程度にドキソルビシンが希釈されているので、この溶液の螢光は、リボソーム内の薬剤の合計量の尺度であった。漏出量は、リボソーム内に残っている薬剤の量の百分率で表されるが、漏出後に得た螢光の増加量と、ドキソルビシンの合計量との比率から算出した。結果を表4に示す。

実施例7

硫酸アンモニウムを充填したリボソームの毒性

2:1モル比の新しい95% EPC/コレステロールを用いて実施例3Aに記載したのと同様にしてリボソームを調製した。実施例1A、2Aおよび3Aに記載したのと同様にしてゲル排除クロマトグラフィーによって外部の硫酸アンモニウムを除去してpH勾配を形成させた。得られたリボソームの半量を、本発明の方法を用いてドキソルビシン

を充填するのに使用した。残りの半量は、350 mg PC/kgのレベルで6匹のBALB-Cマウスの尾の静脈に注射した。これらのマウスを6ヵ月追跡した。マウスは1匹も死なず、すべて正常に挙動した。このレベルでは硫酸アンモニウムリボソームは非毒性であった。

実施例8

ダウノルビシンのリボソームへの充填

硫酸アンモニウムリボソームを、上記実施例2Aと正確に同じにして調製した。取り込まれていない硫酸アンモニウムをセファデックスG-50で分離した後、1 mlのリボソーム分散液を、50℃の1 mlに溶解した10 mgのダウノルビシンと混合し、特定の時間間隔をおいて、一部分を採取した。遊離のダウノルビシンを、実施例1A、2Aおよび3Aでドキソルビシンについて記載したのと同じダウエックス法で除去し、ダウノルビシンの濃度を、ドキソルビシンについて示したのと同様にして測定した。この充填は1時間で完了することが判明し、ダウノルビシンのリン脂質に対する最終モル

比は1:6であった。

実施例9

超音波映像化法に有用なアンモニウム勾配

Ocuscon 128 Computerized Sonography System (米国、カリフォルニア州、オクスコン)をこの試験全体で使用した。モニター方法を改良するために、化粧品品質の水溶性で、かつ塩を含まないLargo Scan-11超微粒子スキャニングゲル(Biometrix社、イスラエル、イエリサレム)で超音波プローブをコートした。

CO₂ガスが炭酸水素アンモニウム(NH₄HCO₃)を含有する媒体を酸性にすることによって生成したことの証明は、超音波プローブで行った。このため、炭酸アンモニウム(0.12M)をビーカーに入れた。超音波プローブをビーカーに接触させた。何のシグナルも認められなかった。HClを加えてpHを4.0に低下させた時、大きなシグナルがスクリーンに現われ、NH₄HCO₃の酸性化によって生成したCO₂が実際にハイパーエコジェニックであることを証明した。

リボソーム内のアンモニウム勾配が、超音波プローブでモニターできるCO₂ガスを発生させるのに利用できることを証明するために、80 mgのEPCと20 mgのコレステロールを用いて、実施例1に記載したのと同様にしてSPLVを調製した。脂質をジエチルエーテルに溶解させた。0.12モルのNH₄HCO₃ 0.5 mlを添加した。他のステップはすべて、上述のものと同じであった。連続熱線照射下でエーテルを蒸発させた後、得られたペーストを1 mlの0.12M NH₄HCO₃に分散させた。NH₄HCO₃をNaCl(0.15M)におき変えたためにアンモニウム勾配が形成されないこと以外同じ条件を用いて対照のSPLVを調製した。1 mlのリボソーム分散液を透析バッグに入れた。Ocuscon プローブを透析バッグに付け、両者をNH₄HCO₃(0.12M)もしくはNaCl(0.15M)の入ったビーカーに入れた。表6に記載した4つの異なる組合せについて試験した。

ビーカー内のNaClに対して透析された時に、NH₄HCO₃を含有するリボソームだけがシグナルを示したという知見は、そのシグナルがNH₄⁺の勾配に

超音波影像化を強化する可能性がマウスで証明された。BALB/C系マウス(27g)をベントバルビタールで麻酔した。次いで NH_4HCO_3 含有のSPLV 0.5 mlを尾の静脈に注射した。マウスの内臓を、超音波プローブと、表示されたソノグラムによってモニターした。ソノグラムに認められた黒点が、アンモニウム勾配リボソームのハイパーエコジェニシティを示した。

表1
リポソームの特性決定

平均・ 直径 (nm)	平均・ 体積 (Å^3) /mole	脂質 /diox. .. (mole) /mole	特異・LHの diox. 濃度 % /mole
323.1 ± 153.9 (2/1)	2.7	3.1	119
214.5 ± 86.0 (2/1)	1.5	5.8	115

土 標準偏差。
平衡に達するまでに除去した後のリン脂質のドキシ
ウエエックグスに対する比率。
小胞内のドキシソリンの計算濃度
(以下条白)

MLVのタイプ	DXR/PL (mole/mole)	4℃, 100時間 その漏出 (%)
MLV	0.26 ± 0.07	26.9
FTMLV	0.42 ± 0.08	15.6
SPLV	0.51 ± 0.11	18.7

特開平2-196713 (22)

表 6

リボソーム 内含物 ビーカー 内含物	NaCl	NH_4HCO_3
NaCl	シグナルなし	30分間以上も 強いシグナルあり
$(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	シグナルなし	シグナルなし

(以下余白)

(発明の要約)

本発明は、トランスメンブラン勾配を利用して、両親媒性薬剤や化学薬品をリボソームに効率よく充填するための、改良されたトランスメンブラン充填法に関する。この方法は、簡単かつ効果的であり、安全かつ経済的であり、そして迅速に行い得る。薬剤または化学薬品を充填して得られたリボソームは、安定かつ安全である。保存し得る形態の充填可能なリボソームは長期間にわたって安定である。この方法はリボソームに封入された薬剤の緩徐放出にも同様に適用し得る。

4. 図面の簡単な説明

第1図は硫酸アンモニウムを含有するリボソーム中への薬剤の封入を示すグラフ図である。第2図はリボソームの内部水性相と外部水性相との間における硫酸アンモニウム分布のpH勾配に対する効果を示すグラフ図である。第3図は硫酸アンモニウムリボソームへの薬剤充填の速度論を示すグラフ図である。第4図は硫酸アンモニウムリボソームからの薬剤の放出を示すグラフ図である。第

5図はリボソームのアンモニウム勾配を利用することによる CO_2 ガスの発生を示すグラフ図である。

以 上

代理人 弁理士 山本秀策

図面の浄書(内容に変更なし)

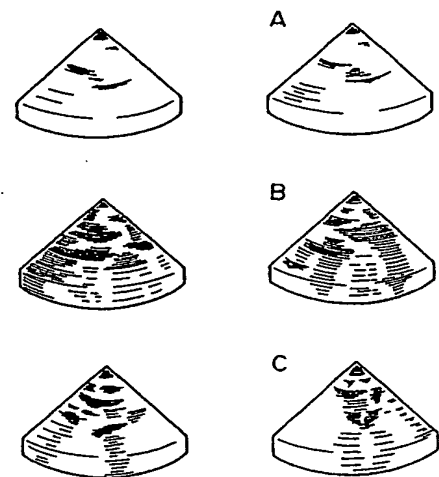


FIGURE 5

特開平2-196713 (23)

FIGURE 1

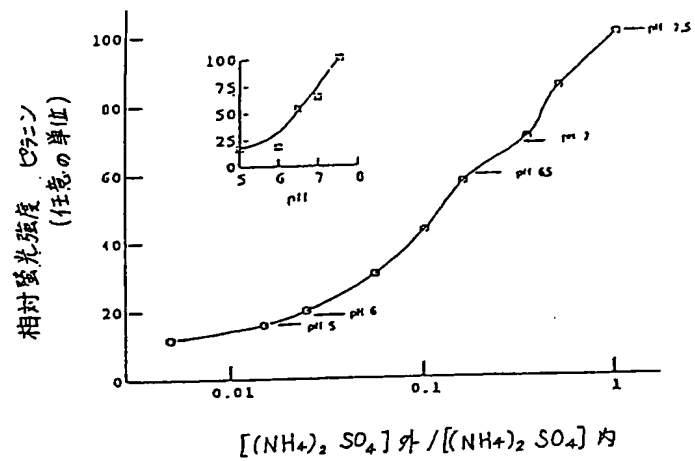
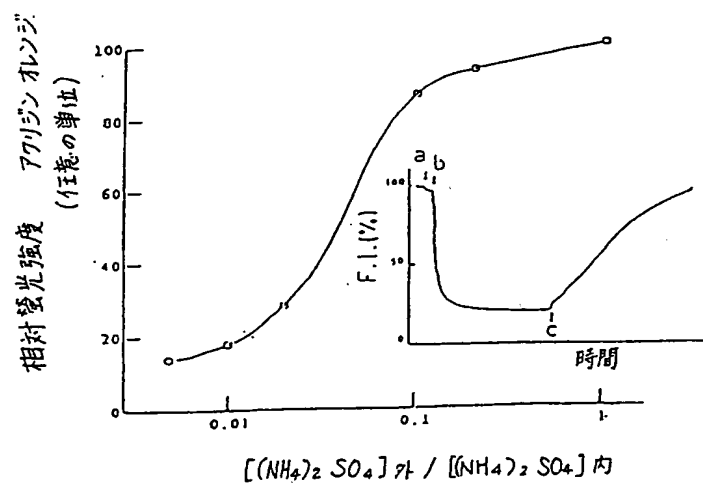


FIGURE 2



特開平2-196713 (24)

FIGURE 3

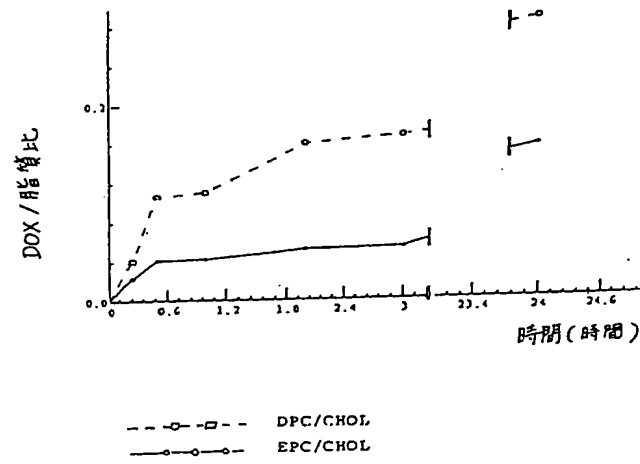
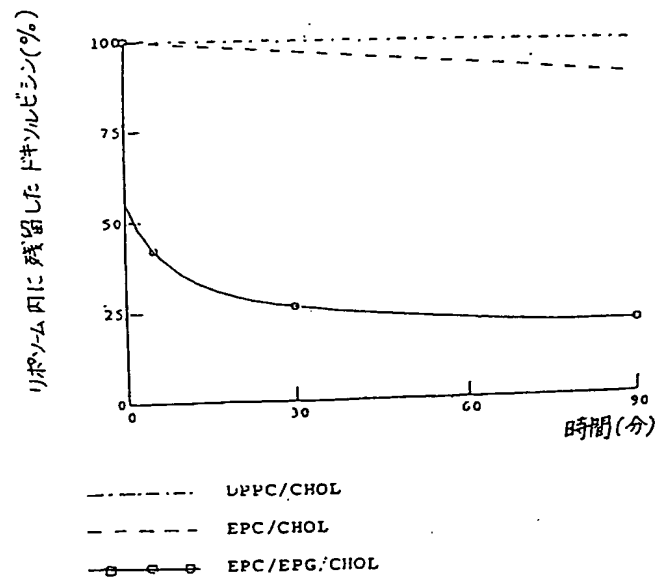


FIGURE 4



特開平2-196713 (25)

第1頁の続き

⑫発 明 者 ギラド ハラーン イスラエル国 エルサレム、ラマトジャレット、ストリート 20/70, カデイス エルオー ゼット

手続補正書（方式）

5. 補正命令の日付（発送日）

平成2年2月6日

平成1年12月26日

特許庁長官殿

6. 補正の対象

1. 事件の表示

願書の特許出願人の代表者の欄、委任状

平成1年特許願第253682号

（訳文添付）、および図面（第5図）

2. 発明の名称

7. 補正の内容

両親媒性分子を有効に充填かつ制御放出
するリボソーム

願書および委任状については別紙のとおり。

図面については願書に最初に添付した図面

3. 補正をする者

の浄書・別紙のとおり（内容に変更なし）。

事件との関係 特許出願人

住所 イスラエル国 エルサレム 91042

ビー.オー. ボックス 4279

ヤボティンスキー ストリート 46

名称 イッサム リサーチ デベロップメント

カンパニー オブ ザ ヒーブル

ユニバーシティ オブ エルサレム

4. 代理人

住所 〒530 大阪府大阪市北区西天満

6丁目1番2号 千代田ビル別館4階

氏名 (7828) 弁理士 山本秀策

電話（大阪）06-361-1139